

SecM에서 유래한 접착펩타이드에 의한 라이보솜 정지를 우회하는 SSU rRNA 돌연변이체 발굴을 위한 유전학적 시스템 개발

하혜정 · 김홍만 · 엄지현 · 이강석*

중앙대학교 자연과학대학 생명과학과

최근 단백질 합성 과정 중 라이보솜의 일시적인 정지에 의한 라이보솜의 A자리에서 전사체가 분해되는 현상이 여러 생명체에서 보고되었다. 이러한 현상이 라이보솜의 작은 소단위체를 이루고 있는 SSU rRNA의 기능과 관련 있는지를 알아보기 위해, SecM에서 유래한 접착펩타이드에 의한 라이보솜 정지를 우회하는 SSU rRNA 돌연변이체 발굴을 위한 유전학적 시스템을 개발하였다. 이 시스템에서는 SecM에서 유래한 접착펩타이드를 포함하는 CAT 단백질을 코딩하는 CAT-SecM 전사체가 플라스미드에서 유래한 SSU rRNA를 포함한 재조합 라이보솜에 의해만 해독된다. 이러한 재조합 라이보솜은 접착펩타이드를 합성한 후 CAT-SecM mRNA 상에서 일시 정제하며, 재조합 라이보솜의 발현은 이 전사체의 양을 감소시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 개발된 시스템을 이용해 라이보솜 정지를 우회하는 SSU rRNA 돌연변이체의 선별이 가능하다는 것을 보여주며, 이러한 변이체에 대한 연구는 단백질 합성 단계에서 일어나는 라이보솜 정지와 전사체 절단 현상에 있어서, SSU rRNA의 역할을 규명하는데 기여할 것이다.

Key words □ protein synthesis, ribosome stalling, SecM, SSU rRNA, sticky peptide

세포 내에서 새로이 생성되고 있는 펩타이드(nascent peptide)나 완전히 성숙된 펩타이드는 단백질의 분비경로에 관여하는 효소들의 도움을 받아 세포막을 통과하여 세포 밖으로 이동하게 된다. *Escherichia coli*의 경우, 이때 관여하는 요소들로 SecYEG 복합체, SecA, SecB, SecM 등이 있다(20). 그 중에서도 SecA는 단백질의 분비 과정에서 필요한 에너지를 제공하는 가장 핵심적인 역할을 한다(25). *secM* (secretion monitor)은 *secA*와 함께 동일한 오페론(operon) 상에서 *secA*의 상류에 위치한다. SecM은 코딩부분에 접착펩타이드(sticky peptide)라고 불리는 특정한 아미노산 서열(F¹⁵⁰XXXXWIXXXXGIRAGP¹⁶⁶)을 가지고 있으며, 이 펩타이드는 SecM 단백질의 발현과정 중 라이보솜 상에서 생성되고 있는 펩타이드의 출구터널(exit tunnel)의 내부와 상호작용하여 단백질의 합성을 정지시키는 현상을 발생시킴으로써, 하류에 위치한 SecA의 발현을 조절한다(24). 단백질 합성 정지현상이 일어나면 라이보솜 내의 A자리(A-site)에서는 *secM-secA* mRNA의 절단이 일어나고, tmRNA (transfer-messenger RNA)가 절단된 mRNA의 3' 말단에 결합하여, tmRNA에 내장된 염기서열을 주형으로 삼아 정지된 해독작용을 재개시켜 단백질 합성을 마무리 시킨다(12, 13, 33). 정상 세포 내에서 일어나는 SecM의 접착 펩타이드에 의한 단백질 합성의 일시적 정지 작용은 세포의 성장에 필요한 에너지를 얻기 위해 SecA를 충분히 발현시키기 위한 필수적인 작용이며, 따라서 SecM의 해독영역(open

reading frame, ORF)의 상단쪽에서 라이보솜의 해독정지작용의 정도에 따라 SecA의 발현양이 결정된다. 또한, SecM에서 유래한 접착 펩타이드는 다른 단백질의 코딩부분에 결합시켜도 단백질 합성의 일시적 정지 작용을 유도하는 것으로 알려져 있다(22).

단백질 합성 중 라이보솜의 일시정지에 의한 A자리에서의 mRNA 분해현상은 애기장대, 초파리, 곰팡이, 바실러스, 인간세포 등의 여러 생물체에서 발견되었으며, 이는 이러한 mRNA 분해 기작이 모든 생명체에 존재하는 공통된 생명현상을 암시한다(5-11, 19, 21, 28, 29, 31, 32). 본 연구에서는 SecM에서 유래한 접착펩타이드를 매개로 하는 라이보솜 해독정지 작용이 결핍된 돌연변이체 SSU (small subunit) rRNA 선별을 위한 유전학적 시스템을 개발하고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 사용된 균주는 *Escherichia coli* DH5 α (F- ϕ 80dlacZAM15, Δ (lacZYA-argF)U169,*deoR,recA1,endA1,hsdR17(rk-mk+),phoA,supE44, γ ,thi-1,gyrA96,relA1?*)이며, LB 배지를 사용하여 배양하였다.

플라스미드의 제조 및 특징

플라스미드 pKAN6 (34)의 아라비노스 프로모터 부분을 *KpnI*과 *XbaI* 제한효소로 절단한 후, *KpnI*과 *SpeI* 제한효소로 절단된 p16ST122 (14) 플라스미드에 삽입하여 플라스미드 pRSS122를

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-820-5241, Fax: 82-2-822-5241
E-mail: kangseok@cau.ac.kr

제작하였다. 플라스미드 pRSS122의 특징은 다음과 같다. 첫째, pKK3535 (1)에서 기원한 *rrnB* 오페론을 가지고 있으며 *lacUV5* 프로모터에 의해 전사가 조절된다. 또한 p16ST122 플라스미드에서 기원한 *cat* (chloramphenicol acetyl transferase) 유전자를 가지고 있으며 아라비노스 프로모터에 의해 전사가 조절된다. 둘째, Lac 억제자를 발현하는 *lacI^q* 유전자(2)와 아라비노스 프로모터의 활성자를 발현하는 *araC* 유전자(17)를 가지고 있다. 셋째, CAT mRNA의 RBS (ribosome binding sequence)는 야생형인 5'-

GGAGG에서 5'-AUCCC로 변형이 되어있고, 16S rRNA 유전자의 MBS (mRNA binding sequence)는 야생형인 5'-CCUCC에서 5'-GGGAU로 변형되어있다. 넷째, IPTG가 없는 배지에서는 pRSS122을 가지고 있는 대장균 세포는 *cat* mRNA를 해독할 수 있는 재조합 라이보솜의 부재로 인해 클로람페니콜(chloramphenicol)에 대한 저항성이 낮으며(최소성장억제농도=50 µg/ml), 0.1 mM IPTG가 포함된 배지에서는 재조합 라이보솜이 발현되어 높은 농도의 클로람페니콜(최소성장억제농도=200 µg/ml)에 저항성을 가

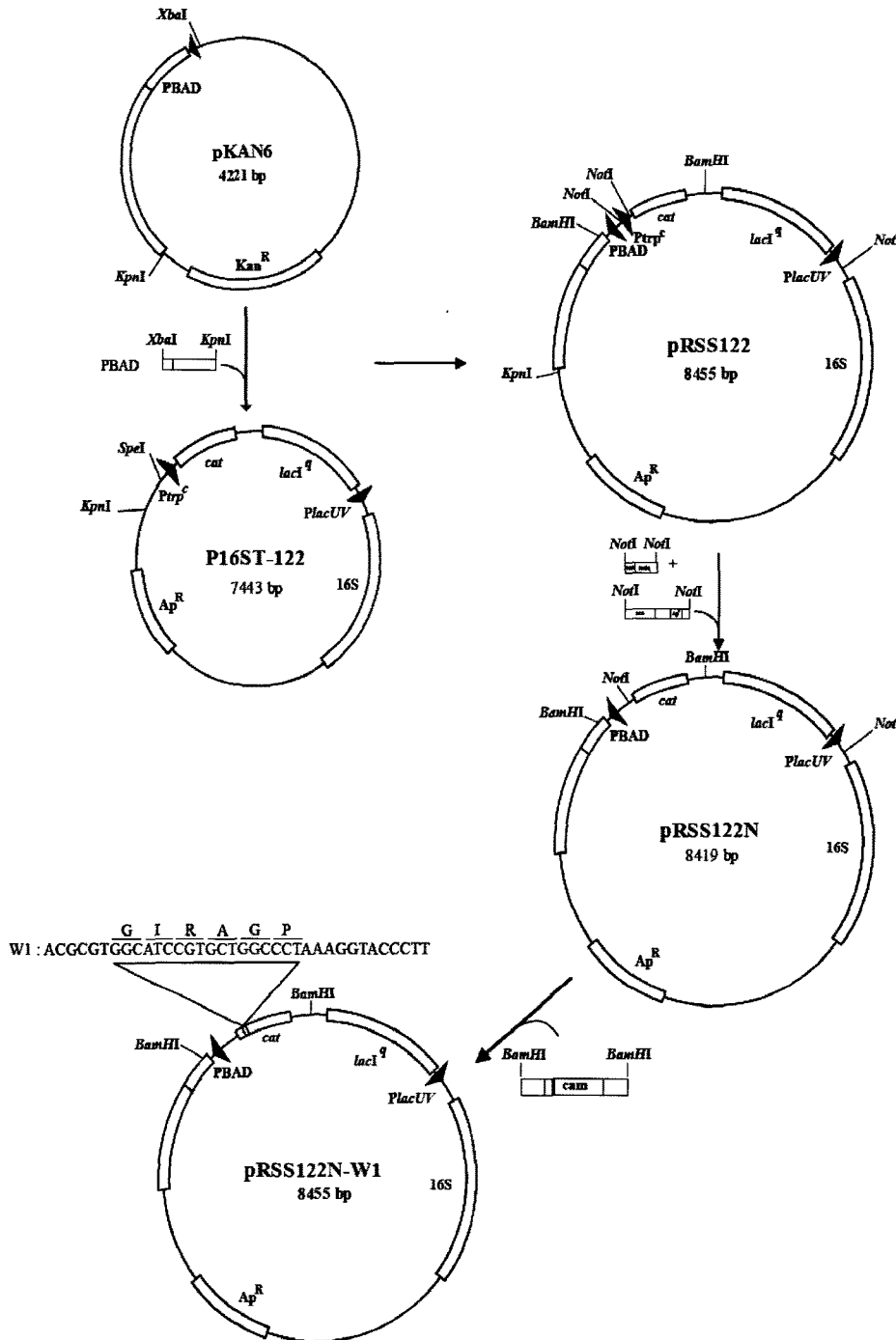


Fig. 1. Construction of pRSS122N-W1. Restriction enzyme sites used in constructing pRSS122N-W1 and ribosome stalling sequence derived from SecM (GIRAGP) are indicated. RBS, ribosome binding site.

지게 된다. 플라스미드 pRSS122를 *NotI* 제한효소로 절단하여 P_{trp}^o 프로모터를 포함하는 34 bp의 DNA 단편을 삭제시키고 남은 2,325 bp DNA 단편과 6,145 bp DNA 단편을 결합시킴으로써 pRSS122N을 얻었고, 이 플라스미드의 *cat* 유전자 부분에 PCR을 수행하여 얻은 라이보솜 정지를 유도하는 SecM에서 유래한 접착펩타이드의 아미노산 서열을 포함하는 DNA 단편을 *Bam*HI로 절단한 후, 삽입하여 pRSS122N-W1을 얻었다(Fig. 1). 이 때 사용되었던 프라이머는 RMC-AIII; 5'-CTGGCTGATACGTTGGTCCT-3', RMC2-1; 5'-CTTTAGGGCCCCA GCACGGATGCCACGCGTTCCAGTGATTTTTTCTCCA-3', RMC3; 5'-GGCATCCGTGCTGGCCCTAAAGTACCCCTTTAT-3', laqI *Bam*HI; 5'-AGACACCGGCATACTCTGC-3'이다.

플라스미드 pRSS122N-W1의 특징은 CAT mRNA에 라이보솜의 단백질 합성을 일시적으로 정지시키는 접착 펩타이드를 코딩하는 염기배열이 존재하며, IPTG가 없는 배지에서는 pRSS122N-W1을 가지고 있는 대장균들은 낮은 농도의 클로람페니콜에 저항성이 있으며(최소생장억제농도=10 µg/ml), 0.1 mM IPTG가 포함된 배지에서는 높은 농도에 저항성이 있다(최소생장억제농도=50 µg/ml).

Western blot 분석

pRSS122N-W1 플라스미드를 가진 세포를 암피실린(ampicillin, 0.1 mg/ml)이 포함된 배지에서 OD₆₀₀=0.1이 될 때까지 배양한 후, 0.1 mM의 IPTG를 첨가하여 재조합 플라스미드로부터 기원한 SSU rRNA를 발현시키는 동시에 0.2% 아라비노스(arabinose)를 첨가하여 SecM에서 유래한 접착펩타이드를 포함한 CAT (CAT-SecM) mRNA의 합성을 유도하였다. OD₆₀₀=1.2에 이를 때, 배양액을 13,000×g에서 3분 동안 원심 분리하여 세포를 모아 PBS (phosphate buffered saline) buffer에 섞은 후, SDS-PAGE 샘플 buffer (100 mM Tris-Cl; pH 6.8, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 30% glycerol, 200 mM β-mercaptoethanol)에 넣고 10분 동안 끓인 후, 10% acrylamide 겔에서 전체 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Protran®, 0.2 µm; Whatman)에 옮긴 다음, 항CAT (Sigma), 항 S1 (34) 항체를 이용하여 분석하였다. 단백질 밴드의 상대적인 양은 Versa Doc 이미징 시스템과 Quantity One 소프트웨어를 이용하여 정량하였다.

Northern blot 분석

세포내의 전체 RNA는 western blot 분석시 사용한 동일한 배양액에서 RNeasy Miniprep Kit (QIAGEN)을 이용하여 추출하였다. 20 µg의 RNA 샘플을 같은 용량의 formamide loading buffer와 섞어서, 70°C에서 10분 동안 변성시킨 다음 8 M urea가 포함된 6% polyacrylamide 겔에서 분리하였다. 분리된 RNA를 0.5× TBE buffer를 사용하여 80 V에서 6시간 동안 nylon membrane (MAGNA, 0.45 Micron)으로 옮긴 후, hybridization buffer [5× SSC (standard saline citrate), 20 mM Na₂HPO₄; pH 7.2, 7% SDS, 1× Denhardt's, denatured herring sperm DNA, 0.1 ng /ml]로 50°C에

서 2시간 동안 혼성시켰다.

^γ32P-ATP (Bio-Rad)와 T4 polynucleotide kinase (NEB)를 이용하여 5'-말단을 표지 시킨 oligonucleotide CAT+90; 5'-GCAACTGACTGAAATGCCTC-3'을 50°C에서 8시간 동안 결합시킨 후, wash solution I (3× SSC, 10× Denhardt's, 5% SDS, 25 mM Na₂HPO₄, pH 7.5)으로 50°C에서 30분 동안 두 번, wash solution II로 50°C에서 30분 동안 각각 두 번씩 씻은 후, CAT mRNA를 탐침하였다. Membrane을 wash solution II로 95°C에서 20분간 씻은 후, 5'-말단이 표지된 M1 탐침 DNA로 M1 RNA를 다시 탐침하였다. 방사능의 양(radioactivity)은 phosphorimager와 Quantity One 소프트웨어를 이용하여 정량하였다.

Toeprinting 분석

전체 라이보솜은 western blot 분석시 사용한 동일한 배양액에서 이전에 보고된 방법(32)을 이용하여 정제하였다. 정제된 라이보솜을 5'-말단이 표지된 프라이머(CAT+90)와 1 mM dNTP (Invitrogen)을 넣고 37°C에서 15분간 반응 시킨 다음, 5 unit의 AMV (NEB)을 첨가하여 37°C에서 15분간 cDNA를 합성하였다. 반응액을 같은 용량의 formamide loading buffer와 섞어서 95°C

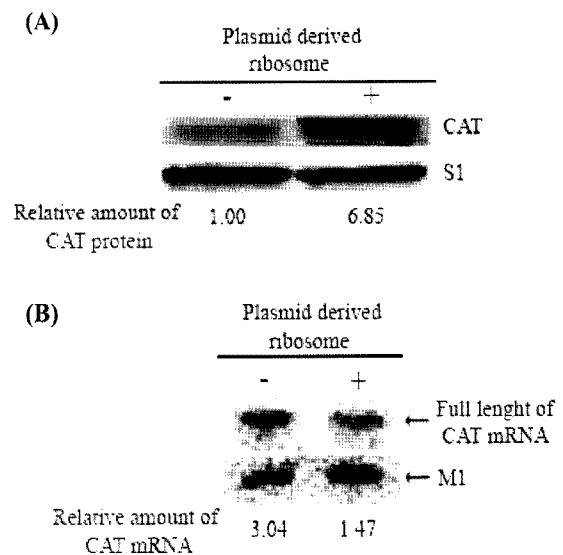


Fig. 2. (A) Western blot analysis of CAT protein. DH5α cells harboring pRSS122N-W1 were grown to OD₆₀₀=0.2, then 0 (-) or 100 µM IPTG (+) and 0.2% arabinose were added to the culture to induce expression of SSU rRNA and CAT-SecM mRNA, respectively. The culture was further grown to OD₆₀₀=1.2 and harvested for total protein preparation. The membrane was probed with anti-CAT monoclonal antibody and quantified the relative abundance of protein bands using Versa Doc imaging system and Quantity One. The same membrane was re-probed with antibody to *E. coli* ribosomal protein S1 to produce a control for possible variations in loading. (B) Northern blot analysis of CAT mRNA. Total RNAs were prepared from the cells grown in the same way described in the Fig. legend 2A. The position of full-length CAT mRNA is indicated and the same membrane was stripped and re-probed for M1 RNA, which is a stable noncoding RNA, to quantiate the relative amount of CAT-SecM mRNA.

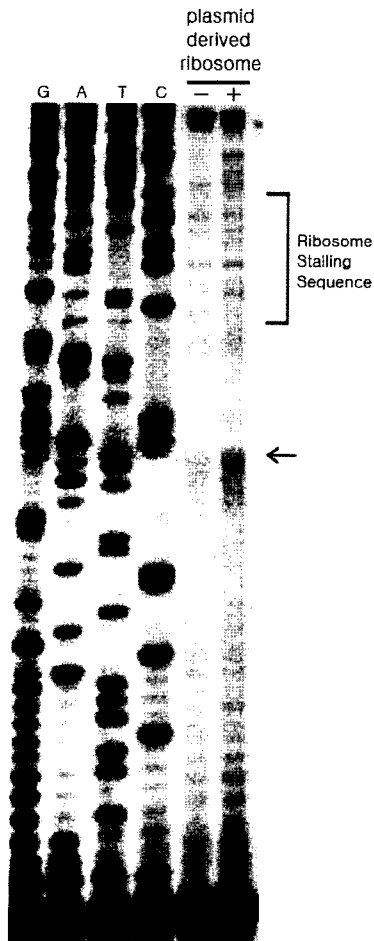


Fig. 3. Toeprinting assay. Total ribosomes were prepared from cells expressing SecM-CAT protein in the presence or absence of 0.1 mM IPTG. The position of stalled ribosome is indicated. A dideoxynucleotide sequence generated with the same primer used in toeprinting assay was run in parallel (lanes 1~4).

에서 5분간 열을 가하여 변형시킨 후, 10% polyacrylamide gel에서 분리하였으며, phosphorimager를 이용하여 결과를 분석하였다. Toeprinting 신호의 위치는 DNA 염기분석 키트(Intron)를 사용하여, pRSS122N-W1을 주형으로 toeprinting에 사용된 5'-말단이 표지된 프라이머(CAT+90)를 확장(extension)하여 확인하였다.

결 과

17개의 아미노산으로 이루어진 SecM에서 유래한 접착 펩타이드($F^{150}XXXXWXXXXGIRAGP^{166}$)는 그 중 C-말단의 여섯 개의 서열(GIRAGP)만으로도 라이보솜의 정지작용을 일으킨다고 보고된 바가 있다(16). 이러한 사실을 이용하여 본 실험에서는 CAT 단백질질을 코딩하는 *cat* 유전자에 SecM에서 유래한 접착 펩타이드(GIRAGP)를 삽입하여 pRSS122N-W1 플라스미드를 제작하였다(Fig. 1). pRSS122N-W1을 포함한 세포는 0.2% 아라비노스 첨가에 의해, CAT-SecM mRNA가 유도되고, 이 전사체는 IPTG에 의해 플라스미드로부터 발현이 유도되는 SSU rRNA를 포함하는

30S 소단위체로 이루어진 재조합 라이보솜에 의해서만 해독이 되도록 특수화되어 있다(6). pRSS122N-W1을 가진 세포는 IPTG가 없는 조건에서는 CAT-SecM 단백질의 발현양이 IPTG가 있을 때보다 6.85배 정도 감소한다는 것을 관찰할 수 있었고(Fig. 2A), 이는 플라스미드로부터 합성이 유도되는 SSU rRNA의 발현에 따라 CAT-SecM mRNA의 해독이 조절된다는 것을 보여준다.

라이보솜의 mRNA 상에서의 일시적인 정지로 인한 A자리에서의 mRNA의 내부분해 현상은 다양한 생명체들에서 존재하는 것으로 보고되었으며(5-11, 19, 26, 28, 29, 31, 32), 특히 SecM에서 유래한 접착펩타이드에 의한 라이보솜의 일시적인 정지는 SecM-SecA mRNA의 분해를 강하게 유도하는 것으로 알려져 있다(26). pRSS122N-W1에서 발현되는 CAT-SecM mRNA 또한 재조합 라이보솜에 의해 분해되는가를 알아보기 위해 이 전사체의 상대적인 양을 Northern blot을 통해 분석하였다. 그 결과 IPTG를 배양액에 첨가하여 CAT-SecM mRNA만을 인식하는 재조합 라이보솜의 발현이 유도되었을 때, 그렇지 않은 경우보다 CAT-SecM mRNA의 상대적인 양이 감소하였음을 확인하였다(Fig. 2B). 또한, SecM에서 유래한 접착펩타이드를 코딩하는 염기배열을 가지고 있지 않는 CAT mRNA의 상대적인 양은 재조합 라이보솜의 발현이 유도되었을 때 증가하는 것을 확인하였다(결과 미제시). 일반적으로 해독빈도가 높은 mRNA는 라이보솜에 의해 mRNA가 리보핵산분해효소에 의한 분해작용으로부터 보호되어 RNA 안정성이 증가되는 것으로 알려져 있으며(3, 4, 6), 이러한 결과는 재조합 라이보솜이 CAT-SecM mRNA의 분해를 유도하였음을 암시하는 결과이다(Fig. 2B).

재조합 라이보솜이 SecM에서 유래한 접착펩타이드의 합성 직후 CAT-SecM mRNA상에서 일시적인 정지현상이 일어나는지를 알아보기 위해서 toeprinting 실험(10)을 수행하였다(Fig. 3). 이 실험을 통해 세포 내에서 단백질 합성 중인 라이보솜의 mRNA 상에서의 위치를 알아볼 수 있다. 간략히 설명하면, mRNA의 3' 말단에 결합하는 5' 말단이 표지된 프라이머를 역전사효소를 이용해 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA의 크기를 분석함으로써 cDNA 합성과정에서 역전사효소가 mRNA상의 라이보솜과 충돌하여 합성이 중단된 위치를 분석하게 된다. 그 결과, SecM에서 유래한 접착펩타이드의 합성 직후의 라이보솜의 위치에서 cDNA의 염기절편의 크기가 축적이 되는 것을 확인하였고, 이는 재조합 라이보솜의 접착펩타이드의 합성 직후 일시적인 정지현상으로 CAT-SecM mRNA의 분해가 유도되었다는 가설을 뒷받침해 준다.

고 찰

본 연구에서는 기존의 재조합 라이보솜 시스템을 변형시켜 SecM에서 유래한 접착펩타이드에 의해 일시적인 정지현상이 일어나지 않게 하는 SSU rRNA를 선별할 수 있는 유전학적 시스템을 개발하고자 하였다. 새로 개발된 시스템에서는 재조합 라이보솜이 접착펩타이드를 합성한 후 CAT-SecM mRNA 상에서 일시 정제하며, 재조합 라이보솜의 발현으로 이 전사체의 양을 감소시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 개발된 시스템을 이용

해 라이보솜 정지를 우회하는 SSU rRNA 돌연변이체의 선별이 가능하다는 것을 보여준다.

초기 생성된 SecM 펩타이드는 라이보솜의 PTC (peptidyl-transferase center) 부위의 근처에 위치한 출구터널과 상호작용을 한다고 알려져 있다. 이때 초기 펩타이드는 23S rRNA 부위 중에서도 A2058과 A749-753 염기 그리고 라이보솜 단백질 L4와 L22와의 상호작용으로 인해 50S의 구조에 있어서 변화가 생기게 된다(22). 50S와 30S 소단위체를 연결시키는 인터브리지(intersubunit bridges)를 비롯해 mRNA와 tRNA가 만나서 코돈-안티코돈 결합이 일어나는 SSU rRNA 상의 부호해독중추(decoding center)를 구조적으로 하나의 연결되어 있는 신호전달 단위로 생각할 수 있는데, 이는 SSU rRNA의 염기가 SecM에 의한 해독정지작용을 와해시켜주는 요소로서 관련되어 있을 수 있다는 가설을 뒷받침한다.

세포 내에서 RNA의 분해와 가공에 있어서 중요한 역할을 하는 대표적인 리보핵산내분해효소(RNase E, RNase G, RNase III, RelE)가 라이보솜의 정지현상이 일어나는 동안에 일어나는 mRNA의 분해현상에 직접적인 영향이 없는 것으로 알려져 있으며(30), 이는 라이보솜의 일시적인 정지에 의해 생기는 mRNA의 A자리에서의 절단현상은 아마도 라이보솜의 내부에서 직접적인 RNA 내분해활성에 의한 것으로 추정된다. 이러한 가설을 증명하기 위해서는 라이보솜의 일시적인 정지를 와해시키는 SSU rRNA의 변이체를 선별할 수 있는 유전학적 시스템이 필요하며, 본 연구에서는 개발한 시스템을 이용하여 이러한 연구가 가능하리라 생각된다.

감사의 말

이 논문은 2008년도 중앙대학교 우수연구자연구비 및 교육과학기술부 21C 프런티어 미생물 유전체 활용기술 개발사업의 지원으로 수행하였습니다.

참고 문헌

- Brosius, J., T. Dull, D. Sleeter, and H.F. Noller. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148, 107-127.
- Calos, M.P. 1978. DNA sequence for a low-level promoter of the lac repressor gene and an "up" promoter mutation. *Nature* 274, 762-765.
- Carrier, T.A. and J.D. Keasling. 1997. Mechanistic modeling of prokaryotic mRNA decay. *J. Theor. Biol.* 189, 195-209.
- Deana, A. and J.G. Belasco. 2005. Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev.* 19, 2526-2533.
- Doma, M.K. and R. Parker. 2006. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440, 561-564.
- Dridger, D., J.M. DiChiara, J. Wei, J.S. Sharp, and D.H. Bechhofer. 2002. Endonuclease cleavage of messenger RNA in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 43, 1319-1329.
- Gaba, A., Z. Wang, T. Krishnamoorthy, A.G. Hinnebusch, and M.S. Sachs. 2001. Physical evidence for distinct mechanisms of translational control by upstream open reading frames. *EMBO J.* 20, 6453-6463.
- Gatfield, D. and E. Izaurralde. 2004. Nonsense-mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in *Drosophila*. *Nature* 429, 575-578.
- Geballe, A.P. and M.S. Sachs. 2000. Translational control by upstream open reading frames, p. 595-614. In N. Sonenberg, J.W.B. Hershey, and M.B. Mathews (eds.), *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y., USA.
- Hartz, D., D.S. McPheeters, R. Traut, and L. Gold. 1988. Extension inhibition analysis of translation initiation complexes. *Methods Enzymol.* 164, 419-425.
- Hayes, C.S. and R.T. Sauer. 2003. Cleavage of the A site mRNA codon during ribosome pausing provides a mechanism for translation quality control. *Mol. Cell.* 12, 903-911.
- Karzai, A.W., E.D. Roche, and R.T. Sauer. 2000. The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat. Struct. Biol.* 7, 449-455.
- Keiler, K.C., P.R. Waller, and R.T. Sauer. 1996. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* 271, 990-993.
- Lee, K., C.A. Holland-Staley, and P.R. Cunningham. 2001. Genetic approaches to studying protein synthesis: Effects of mutations at Ψ 516 and A535 in *Escherichia coli* 16S rRNA. *J. Nutr.* 131, 2994S-3004S.
- Lee, K., C.A. Holland-Staley, and P.R. Cunningham. 1996. Genetic analysis of the Shine-Dalgarno interaction: selection of alternative functional mRNA-rRNA combinations. *RNA* 2, 1270-1285.
- Lee, K., S. Varma, J. SantaLucia, and P. Cunningham. 1997. *In vivo* determination of DNA structure-function relationships: analysis of the 790 loop in ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* 269, 732-743.
- Lee, N., C. Francklyn, and E.P. Hamilton. 1987. Arabinose-induced binding of AraC protein to araI2 activates the araBAD operon promoter. *PNAS* 88, 8814-8818.
- Lopez, P.J., I. Marchand, O. Yarchuk, and M. Dreyfus. 1998. Translation inhibitors stabilize *Escherichia coli* mRNAs independently of ribosome protection. *PNAS* 95, 6067-6072.
- Lovett, P.S. and E.J. Rogers. 1996. Ribosome regulation by the nascent peptide. *Microbiol. Rev.* 60, 366-385.
- Mori, H. and K. Ito. 2001. The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol.* 9, 494-500.
- Morris, D.R. and A.P. Geballe. 2000. Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8635-8642.
- Murakami, A., H. Nakatogawa, and K. Ito. 2004. Translation arrest of SecM is essential for the basal and regulated expression of SecA. *PNAS* 101, 12330-12335.
- Nakatogawa, H. and K. Ito. 2001. Secretion monitor, SecM, undergoes self-translation arrest in the cytosol. *Mol. Cell.* 7, 185-192.
- Nakatogawa, H. and K. Ito. 2002. The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate. *Cell* 108, 629-636.
- Oliver, D.B. and J. Beckwith. 1982. Regulation of a membrane component required for protein secretion in *Escherichia coli*. *Cell* 30, 311-319.
- Onouchi, H., Y. Nagami, Y. Haraguchi, M. Nakamoto, Y. Nishimura, R. Sakurai, N. Nagao, D. Kawasaki, Y. Kadokura, and S.

- Naito. 2005. Nascent peptide-mediated translation elongation arrest coupled with mRNA degradation in the *CGS1* gene of *Ara-bidopsis*. *Genes Dev.* 19, 1799-1810.
27. Powers, T. and H.F. Noller. 1991. A functional pseudoknot in 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* 10, 2203-2214.
28. Raney, A., G.L. Law, G.J. Mize, and D.R. Morris. 2002. Regulated translation termination at the upstream open reading frame in s-adenosylmethionine decarboxylase mRNA. *J. Biol. Chem.* 277, 5988-5994.
29. Sachs, M.S. and A.P. Geballe. 2002. Biochemistry. Sense and sensitivity-controlling the ribosome. *Science* 297, 1820-1821.
30. Sunohara, T., K. Jojima, H. Tagami, T. Inada, and H. Aiba. 2004. Ribosome stalling during translation elongation induced cleavage of mRNA being translated in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279, 15368-15375.
31. Tenson, T. and M. Ehrenberg. 2002. Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel. *Cell* 108, 591-594.
32. Vilela, C. and J.E. McCarthy. 2003. Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5' untranslated region. *Mol. Microbiol.* 49, 859-867.
33. Withey, J.H. and D.I. Friedman. 2002. The biological roles of trans-translation. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 154-159.
34. Yeom, J.H. and K. Lee. 2006. RraA rescues *Escherichia coli* cells over-producing RNase E from growth arrest by modulating the ribonucleolytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1372-1376.

(Received October 1, 2008/Accepted October 15, 2008)

ABSTRACT : Development of Genetic System for Isolation of SSU rRNA Mutants that Bypass SecM-Mediated Ribosome Stalling

Hye-Jeong Ha, Hong-Man Kim, Ji-Hyun Yeom, and Kangseok Lee* (Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Republic of Korea)

Ribosome stalling by nascent sticky peptide has been reported in several organisms across the kingdom. To test whether small subunit (SSU) rRNA is involved in this phenomenon, we developed a genetic system that utilized the specialized ribosome system to isolate SSU rRNA mutants that enable ribosomes to bypass the SecM-derived sticky peptide in protein synthesis. In this system, CAT-SecM mRNA, which encodes CAT protein containing the sticky peptide derived from SecM, is only translated by specialized ribosomes. These ribosomes were shown to transiently stall on CAT-SecM mRNA followed by the synthesis of the sticky peptide. Expression of specialized ribosomes resulted in the decreased steady-state level of CAT-SecM mRNA, which is consistent with a notion that ribosome stalling induces mRNA degradation. Isolation and characterization of SSU rRNA mutations using this genetic system that are sufficient to circumvent ribosome stalling induced by the SecM-derived sticky peptide will provide evidence of SSU rRNA function in mRNA cleavage.